DESARROLLO DE LA ANTERA Y FORMACIÓN DEL GRANO DE POLEN EN *Cestrum bigibbosum* Francey (SOLANACEAE)

Development of anther wall and formation of pollen grain in *Cestrum bigibbosum* Francey (Solanaceae)

Mercedes E. Castro Laportte[a] & Beatriz Galati[b]

[a] Instituto de Botánica Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Apdo. Postal 4579 Maracay – Venezuela. Correo electrónico: laportte@hotmail.com

[b] Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires C.P. 1428. Buenos Aires - Argentina

Resumen

La pared de la antera madura de *Cestrum bigibbosum* presenta una epidermis papilosa y una capa de endotecio. El patrón de desarrollo de la pared de la antera es del tipo dicotiledóneo, con divisiones periclinales en algunas zonas de la capa media. El endotecio presenta engrosamientos reticulados, con mayor ramificación hacia la parte media de la célula. El tapete es del tipo secretor, con algunas células binucleadas y degenera en el estado de microsporas libres. La división de las células madre de las microsporas es simultánea con formación centrípeta de la pared celular, dando lugar a una tétrada de microsporas tetraédrica. Los granos de polen son liberados en estado bicelular. Se discute el significado taxonómico de las características del gametofito masculino para la especie.

Palabras clave: Solanaceae, *Cestrum*, gametofito masculino, polen, pared de la antera, endotecio, tapete.

Abstract

The mature anther wall of *Cestrum bigibbosum* consist of a papillae epidermis and one layer of endothecium. The development of the anther wall retrieves the dicotyledoneous type, showing periclinal division in some zones of the middle layer. The endothecium shows a reticulate pattern of thickening, with more branches in the central region of the cell. The tapetum is secretory and degenerates at the free microspore stage. Microspore tetrads are tetrahedral and the pollen grain is two-celled at the shedding stage. Taxonomic significance of male gametophyte is discussed.

Key Words: Solanacaeae, *Cestrum*, male gametophyte, pollen, anther wall, endothecium, tapetum.

Introducción

El género *Cestrum* Francey pertenece a la tribu Cestreae (Solanaceae) y está constituido por aproximadamente 150 especies que se distribuyen desde el norte de México hasta el sur de Chile, siendo *C. bigibbosum* Pittier una especie endémica de Colombia y Venezuela, la cual crece en los estratos medios de selvas siempreverdes (Benítez & D´Arcy 1998).

La caracterización del desarrollo del gametofito masculino puede brindar información de utilidad taxonómica y sistemática, particularmente lo referido al

Recibido: 15/11/2011- Aceptado: 15/02/2012

número de capas de la pared de la antera, tipo de tapete, arreglo de las tétradas, así como las características del grano de polen (Galati *et al*. 2006; Liu & Huang 2003). En *Cestrum* se han realizado pocos estudios de la ontogenia de las estructuras reproductivas, encontrándose referencias en trabajos generales de las Solanaceae (Carrizo 2002a, b).

Los tipos de antera se han clasificado con base a los patrones de división de las capas parietales secundarias (Davis 1966), siendo señalado para las Solanaceae los tipos dicotiledóneo (Davis 1966; Carrizo 2002a) y básico (Alemany 1985; Barboza 1991; Carrizo 1998, 2002a). A nivel del endotecio, para la familia se ha indicado la presencia de cuatro tipos de patrones de engrosamiento (anular, helicoidal, reticulado y palmado), presentándose generalmente sólo un tipo de engrosamiento por especie (Carrizo 2002a). El tapete es un tejido que contribuye a la nutrición y desarrollo de los granos de polen (Pandey 1997), siendo común el tipo secretor en las Solanaceae (Chapman 1987; Jhori *et al*. 1992). El polen en el grupo es heterogéneo, presentándose en estado bicelular (Johri *et al.* 1992) o tricelular (Barboza 1989) al ser liberado.

La presente investigación es una contribución al conocimiento del desarrollo del gametofito masculino en *Cestrum* así como una aproximación a su posible utilidad taxonómica y sistemática en este grupo.

Materiales y Métodos

Se colectaron anteras provenientes de yemas florales en distintos estados de desarrollo y de flores en antesis, de *C. bigibbosum* en poblaciones naturales presentes en la selva nublada ubicada en los alrededores de la Estación Biológica "Alberto Fernández Yepéz" de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, en el Parque Nacional Henri Pittier, a una altura aproximada de 1000 msm, un rango anual de precipitación de 1700 mm y una temperatura media anual de 18 - 21° C.

Microscopía óptica: las anteras se fijaron en FAA 50% (formalina, etanol 50%, ácido acético) y posteriormente se embebieron en parafina (Johansen 1940). Se obtuvieron secciones de aproximadamente 10 µm utilizando un microtómo de rotación, las cuales fueron teñidas con safranina – fast green (Johansen 1940). El material fue observado y fotografiado en un microscopio Wild M20.

Estudio de engrosamiento de las paredes del endotecio: se tomaron anteras maduras de flores en antesis y se colocaron en hipoclorito de sodio comercial al 50% por aproximadamente 10 minutos, a fin de diafanizarlas. Luego se lavaron con agua destilada, se montaron en agua:glicerina (1:1), preparando así láminas semi-permanentes. Las preparaciones fueron observadas con un microscopio de contraste de fase diferencial (DIC) marca Leitz.

Morfología del polen: Para los estudios de microscopía óptica (MO), el polen fue acetolizado siguiendo la metodología de Erdtman (1966), mientras que para los estudios de microscopía electrónica de barrido (MEB), se utilizó polen sin acetolizar. Se analizaron 20 granos de

polen por especie y se midieron los siguientes parámetros: largo del eje polar (P) y ecuatorial (E) en vista ecuatorial, largo del eje ecuatorial en vista polar (D), largo del colpo (LC) y grosor de la exina (EX). Asimismo, se determinó la forma, tamaño y patrón de ornamentación de la exina siguiendo la terminología de Erdtman (1966) y Punt *et al*. (2007).

Resultados

Microesporangio: la pared de la antera madura está formada por una epidermis papilosa y una capa de endotecio. El desarrollo de la pared es del tipo dicotiledóneo, pero algunas células se dividen periclinalmente, formando dos capas medias en algunos puntos (Figura 1a, 2a). Las papilas epidérmicas comienzan a desarrollarse en estados tempranos (Figura 1c) y muestran una cutícula ornamentada en la madurez (Figura 1e, 2e).

Las células del endotecio se presentan alargadas periclinalmente, con engrosamientos fibrosos del tipo reticulado, que presentan pocas ramificaciones hacia la parte media de la célula (Figura 2f). La capa media se degenera muy rápidamente en el estado de tétrada de microsporas (Figura 1b-c). El tapete es secretor y uniseriado, observándose algunas células binucleadas, debido a la ocurrencia de divisiones nucleares libres (Figura 1c). Las células del tapete degeneran en los primeros estados del grano de polen bicelular.

Microsporogénesis y microgametogénesis: las células madre de las microsporas son uninucleadas y cuando inician la división meiótica están rodeadas por una pared de calosa gruesa (Figura 1b, 2b). La citocenesis es simultánea y el arreglo de las microsporas es tetraédrico (Figura 1c, 2c) y cuando la pared de calosa se degrada, las microsporas se separan e inician el desarrollo de la pared de esporopolenina (Figura 1f – h). La división del grano de polen es desigual, originando una célula vegetativa grande y una célula generativa lenticular pequeña (Figura 1i, 2e). Esta última se separa de la pared del grano de polen y está rodeada por el citoplasma de la célula vegetativa, con conexiones citoplasmáticas evidentes entre ambas células (Figura 1j).

Morfología del polen: el polen en esta especie es trizonocolporado, anguloaperturado y prolato-esferoidal (Figura 3 a – b), con una exina reticulada en el mesocolpio y rugulada hacia el apocolpio (Figura 3 c – d).

Discusión

La anatomía de la antera madura de *C. bigibbosum* es similar a lo señalado para esta especie por Castro *et al.* (1999). El desarrollo de la pared de la antera es del tipo dicotiledóneo, siendo distinto al observado por Carrizo (2002a) en otra especie de *Cestrum*, donde se observó que la formación de la pared de la antera es del tipo básico, pero coincide con lo encontrado por la autora para otros grupos de Solanaceae. En este sentido, se ha indicado que algunas características del gametofito masculino, entre ellos la formación de la pared de la antera pueden tener utilidad sistemática, ya que cada familia tiende a presentar un patrón particular (Chehregani *et al*. 2008); sin embargo en las Solanaceae este patrón es variable y no parece reflejar

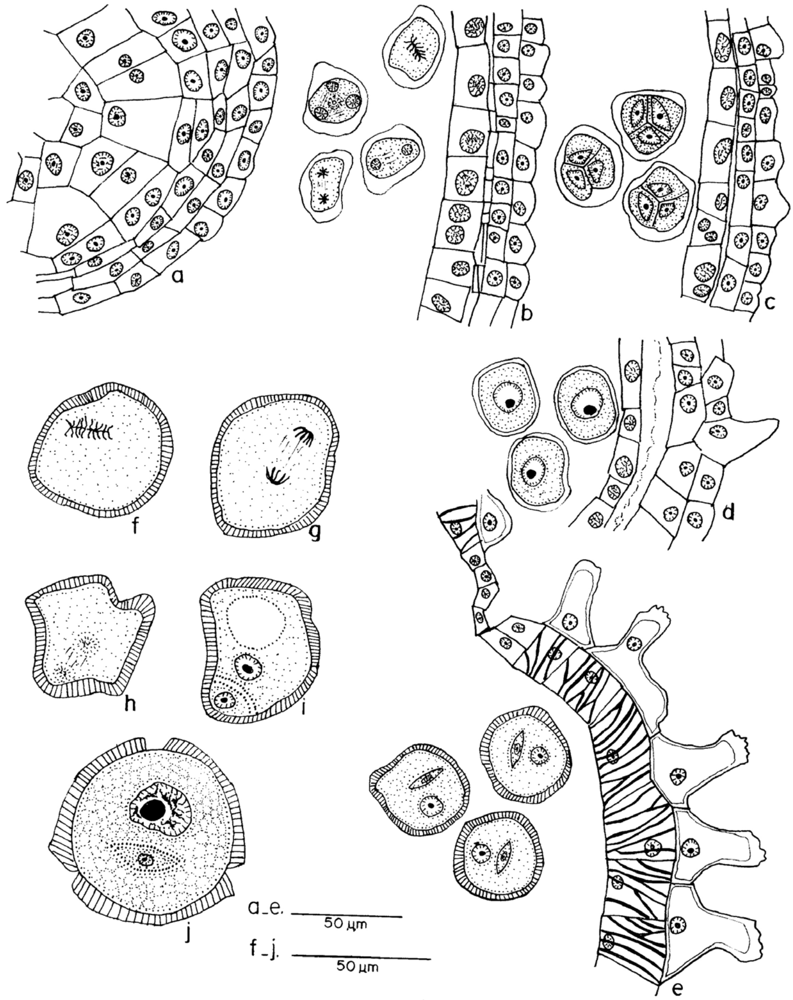


Figura 1. Microesporogénesis y microgametogénesis en *Cestrum bigibbosum*. (a) Sección transversal de la pared de la antera joven, tejido esporógeno, (b) división meiótica de las células madre de las microsporas; (c) tétrada de microsporas maduras (d)Sección transversal de la pared de la antera con células del tapete degeneradas y microsporas libres; (e) Sección transversal de la pared de la antera madura con granos de polen en estado bicelular. Formación del grano de polen bicelular: (f) metafase, (g) anafase, (h) telofase, (i) separación desigual de la célula generativa y la célula vegetativa, (j) grano de polen bicelular.

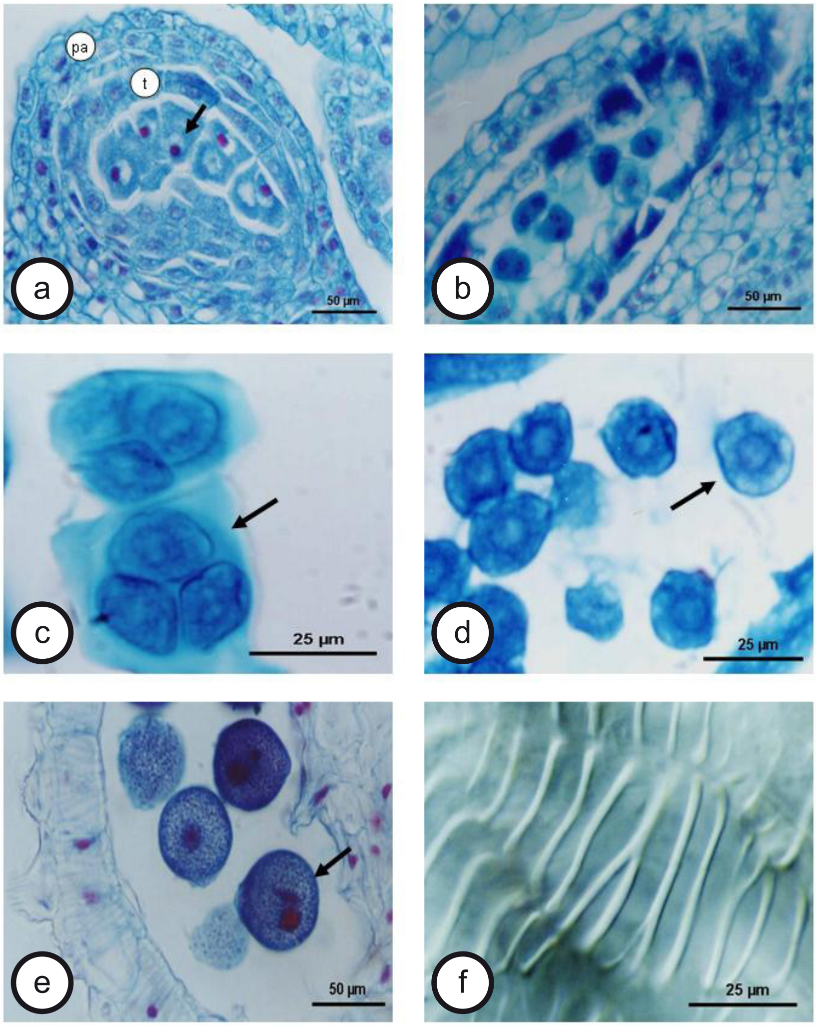


Figura 2. Vista transversal de la microsporogénesis y microgametogénesis en *Cestrum bigibbosum*, al microscopio óptico. (a) Antera madura, mostrando la pared de la antera, tapete y las células madre de las microsporas (señaladas con flecha); (b) División meiótica de las células madre de las microsporas; (c) Tétradas de microsporas maduras (señalada con flecha); (d) Microsporas libres (señalada con flecha); (e) Antera madura con granos de polen en estado bicelular; (f) Vista paradérmica de las células endoteciales, mostrando engrosamientos del tipo reticulado. **pa**: pared de la antera; **t**: tapete

relaciones filogenéticas, ya que en los grupos que conforman la subfamilia Cestroideae se presentan los tipos básico y dicotiledóneo (Olmstead *et al*. 2008). En la tribu Cestreae, sólo se había señalado la ocurrencia del tipo básico (Carrizo 2002a), pero los resultados obtenidos en esta investigación indican la ocurrencia de ambos tipos de patrones de desarrollo. No obstante, este carácter ha sido poco estudiado en la familia y es conveniente seguir explorándolo a fin de establecer su posible utilidad taxonómica.

En la formación de la pared de la antera de esta especie se presentan divisiones periclinales en células relacionadas ontogenéticamente con el tapete, presentándose una capa media bicelular en algunas zonas. Esta característica sugiere que el patrón dicotiledóneo podría derivar del tipo básico por supresión de las divisiones periclinales de la capa parietal secundaria interna, tal como igualmente plantea Carrizo (2003), quien observa que en distintos grupos de Solanaceae se distinguen hasta tres diferentes secuencias de división, lo que estaría indicando la estrecha relación entre los distintos tipos de formación de la pared de la antera.

Los engrosamientos a nivel del endotecio muestran distintos patrones, los cuales pueden tener valor taxonómico y sistemático en algunos grupos de plantas, tales como Asteraceae (Abid & Qaiser 2004), Araceae (French 1985), Begoniaceae (Tebbitt 1999) y Poales (Manning & Linder 1990). En las Solanaceae, se ha señalado la presencia de cuatro tipos distintos de engrosamientos endoteciales (Carrizo 2002b). *C. bigibbosum* muestra engrosamientos del tipo reticulado, coincidiendo con lo encontrado para distintas especies de la tribu Cestreae (Carrizo 2002b), lo que hace suponer que este patrón de engrosamiento es común a este grupo. Sin embargo, la ocurrencia de ramificaciones escasas en la parte central de la célula observado en esta especie, resulta ser ligeramente distinto al subtipo reticulado que presentaron las tres especies de *Cestrum* estudiadas por Carrizo (2002b), caracterizado por presentar mayor número de ramificaciones hacia los extremos de la célula y engrosamientos helicoidales hacia la región central. Estos resultados sugieren que en este género pueden presentarse distintos subtipos del patrón reticulado, por lo que es necesario continuar explorando este carácter a fin de determinar su posible utilidad taxonómica y sistemática dentro del grupo.

El tapete es una capa de células especializadas que rodea al tejido esporógeno, teniendo importancia nutricional, ya que suple a los granos de polen en formación de diversas enzimas y precursores de la exina (Chapman 1987; Pacini & Franchi, 1993; Pacini *et al*. 1985; Pacini 1990). Este tejido en las angiospermas puede ser básicamente de dos tipos: ameboide y secretor, aunque se ha señalado la ocurrencia de un tipo intermedio denominado invasivo (Furnes & Rudall 2001). En las Solanaceae, se ha observado la presencia de tapete del tipo secretor (Barboza 1989; Maheshwari 1950) y ameboide (Pacini *et al*. 1985). En *C. biggibosum* el tapete es secretor, tal como se ha encontrado en otras Solanaceae (Bhandari 1984), siendo éste el tipo más común en las eudicotiledóneas (Furnes &

Rudall 2001; Pacini *et al*. 1985). Asimismo, la especie estudiada mostró células binucleadas en el tapete, característica que se ha observado en diversos grupos de angiospermas (Chehregani *et al*. 2008; Tang *et al*. 2009; Duarte-Silva *et al*. 2010) y se ha planteado que ésta puede ser una de las vías en que se incrementa el contenido de ADN total de este tejido (Pandey 1977). Los patrones de división de las células madre de las microsporas en angiospermas pueden ser simultáneos o sucesivos (Sampson 1969). En *C. bigibbosum* se observó el tipo simultáneo, que se caracteriza porque la segunda división meiótica ocurre inmediatamente después de la primera, sin que ocurra citocinesis intermedia, con formación centrípeta de la pared celular, dando lugar a una tétrada de microsporas tetraédrica (Davis 1966; Pandey 1997). Este patrón de formación de las microsporas aparentemente es un

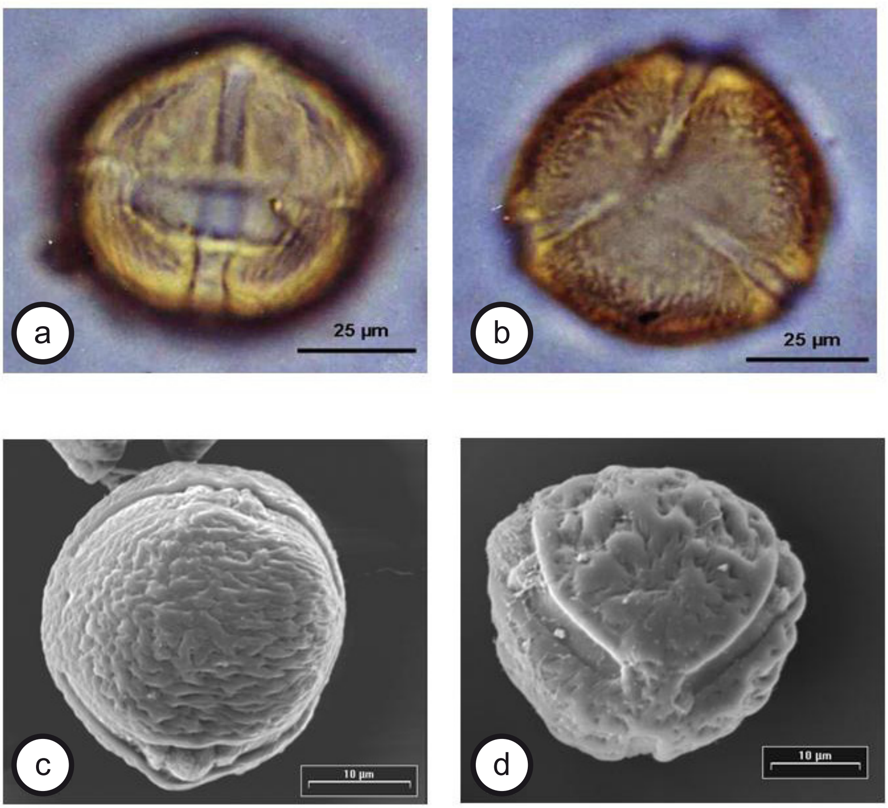


Figura 3. Polen de *Cestrum bigibbosum*. a-b) Microscopía óptica (a) Vista ecuatorial; (b) Vista polar; c-d) microscopía electrónica (c) Vista polar; (d) Vista ecuatorial.

carácter pleisomórfico de las angiospermas (Nadot *et al*. 2008), siendo común en la mayoría de las eudicotiledóneas (Furness *et al*. 2002), y se ha asociado con las aperturas tricolpadas del grano de polen y sus tipos derivados, tales como las tricolporadas (Furness & Rudall 1999), lo que coincide con el tipo de polen que se observa en *C. bigibbosum*.

Conclusiones

El desarrollo de la pared de la antera en *C. bigibbosum* es del tipo dicotiledóneo, con divisiones periclinales en algunas zonas de la capa media, siendo la primera vez que se observa este patrón de desarrollo en la tibu Cestreae.

Los engrosamientos del endotecio son del tipo reticulado, similar a lo encontrado para otras especies de *Cestrum*, pero con un patrón de ramificación diferente, lo que sugiere que este carácter podría tener utilidad taxonómica en el grupo.

El tapete es del tipo secretor y la división de las células madre de las microsporas es simultánea, formando tétradas de microsporas tetraédricas, lo que es común en la mayoría de las eudicotiledóneas.

El gametofito masculino presenta algunas características que pueden ser de utilidad taxonómica y sistemática en *Cestrum*, pero es necesario continuar los estudios embriológicos en otras especies para establecer el valor de los mismos.

Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela por el financiamiento parcial de esta investigación, a la Dra. Gloria Barboza del Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal de la Universidad Nacional de Cordoba (Argentina) por su colaboración en el procesamiento del material vegetal y a la Dra. Damelis Jáuregui del Instituto de Botánica Agrícola de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela por la revisión del manuscrito.

Referencias bibliográficas

ABID, R. & M. QAISER. 2004. The endothecium in ***Inula*** L. and its allied genera (Inuleae – Compositae) from Pakistan and Kashmir. *Pak. J. Bot.* 36: 481 – 486.

ALEMANY, J. 1985. Flor, esporogénesis y gametogénesis de ***Nierembergia hippomanica*** (Solanaceae). *Bol. Soc. Arg. Bot.* 24: 49-69.

BHANDARI, N. 1984. The microsporangium . In: JOHRI, B.M. (ed.). *Embriology of angiosperms*. Springer – Verlag, Berlín pp. 53 –121.

BARBOZA, G. 1989. Sobre la naturaleza tricelular de los granos de polen en la tribu Jaboroseae (Solanaceae). *Kurtziana* 20: 139 – 145.

BARBOZA, G. 1991. El sistema reproductivo en *Jaborosa* (Solanaceae). *Kurtziana* 21: 39-79.

BENITEZ, C. & W. D´ARCY. 1998. The genera ***Cestrum*** and ***Sessea*** (Solanaceae: Cestreae) in Venezuela. *Ann. Missouri Bot. Gard*. 85: 273 – 351.

CARRIZO, C. 1998. Sobre el androceo y el gineceo en la tribu Datureae (Solanaceae) y su implicancia taxonómica. *Kurtziana* 26: 33-53.

CARRIZO, C. 2002a. An approach to the diversity of endothecial thickenings in Solanaceae. *Flora* 197: 214 -223.

CARRIZO, C. 2002b. Anther wall formation in Solanaceae species. *Ann. Bot.* 90: 701 -706.

CARRIZO, C. 2003. Combination of sequences of cell divisions in the anther wall formation in Solanaceae species. *Flora* 198: 243 -246.

CASTRO, M., D. JAUREGUI & E. CAMACHO. 1999. Caracterización anatómica del androceo de cinco especies de ***Cestrum*** L. (Solanaceae). *Anales de Botánica Agrícola* (Venezuela) 6: 61-66.

CHAPMAN, G. 1987. The tapetum. *International Review of Cytology* 107: 111 – 125.

CHEHREGANI, A., N. TANAOMI & M. RANJBAR. 2008. Pollen and anther in ***Onobrychis schahuensis*** Bornm. (Fabaceae). *Int. J. Bot* 4: 241 - 244.

DAVIS, G. 1966. *Systematic embriology of the angiosperms*. John Wiley & Sons Inc., New York. 528 p.

DUARTE- SILVA, E., A. VANZELA. & J. MARIATH. 2010. Developmental and cytogenetic analyses of pollen sterility in ***Valeriana scandens*** L. *Sexual Plant Reproduction* 23: 105 – 113.

ERDMANT, G. 1966. *Pollen morphology and plant taxonomy. An introduction to palinology, I. Angiosperms*. Hafner, New York. 261 pp.

FRENCH, J. 1985. Patterns of endothecial wall thickenings in Araceae: Subfamilies Calloideae, Lasioideae and Philodendroideae. *Bot Gaz*. 146: 521 – 533.

FURNES, C. & P. RUDALL. 1999. Microsporogenesis in monocotyledons. *Ann. Bot.* 84: 475 – 499.

FURNES, C. & P. RUDALL. 2001. The tapetum in basal angiosperms: early diversity. *Int. J. Plant Sci.* 162: 375 – 392.

FURNES, C. P. RUDALL & B. SAMPSON, B 2002. Evolution of microsporogenesis in angiosperms. *Int. J. Plant Sci.* 163: 235 -260.

GALATI, B., S. ROSENFELDT & G. TOURN. 2006. Embryological studies in ***Lotus glaber*** (Fabaceae) *Ann. Bot. Fenn.* 43: 97 -106.

JOHANSEN, D. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw Hill Book Company, Inc. New York. 523 pp.

JOHRI, B.M.; K.B. AMBEGAOKAR & P.S. SRIVASTAVA. 1992. *Comparative embriology of angiosperms*. Vol 2. Springer – Verlag, Berlin. pp. 712 – 715.

LIU, C. & T. HUANG. 2003. Anther and pollen wall development in ***Dumasia miaoliensis*** Liu and Lu (Fabaceae). *Taiwania* 48: 273 - 281.

MAHESHWARI, P. 1950. *An introduction to the embriology of angiosperms*. First Edition. McGraw Hill Book Company, New York. 453 pp.

MANNING, J. & H. LINDER. 1990. Cladistic analysis of patterns of endothecial thickenings in the Poales/ Restionales. *Amer. J. Bot.* 77: 196 – 210.

NADOT, S., C. FURNESS, J. SANNIER, L. PENET, S. TRIKI-TEURTROY, B. ALBERT & A. RESSAYRE. 2008. Phylogenetics comparative of microsporogenesis in angiosperms with focus in monocots. *Ann. Bot.* 95: 1426 – 1436.

OLMSTEAD, R., L. BOHS, H. MIGLD, E. SANTIAGO-VALENTIN, V. GARCÍA & S. COLLIER. 2008. A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon* 57: 1159 -1181.

PACINI, E. 1990. Tapetum and microspore function. In: BLACKMORE. S. & R. KNOX. (eds). *Microspore evolution and ontogeny*. Academic Press, Londres. p. 213 237.

PACINI, E. & G. FRANCHI**.** 1993. Role of the tapetum in pollen and spore dispersal. *Plant Syst. Evol*. 7 (supplement): 1 -11.

PACINI, E., G. FRANCHI & M. HESSE. 1985. The tapetum: its form, function and possible phylogeny in Embriophyta. *Plant Syst. Evol.* 149: 155 -185.

PANDEY, A. 1997. *Introduction to embriology of angiosperms*. CBS Publishers & distributors, New Delhi. 224 pp.

PUNT, W., P. HOEN, S. BLACKMORE, S. NILSSON & A. THOMAS**.** 2007. Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Paleobotany and Palynology* 143: 1 – 81.

SAMPSON, F. 1969. Cytokinesis in pollen mother cells of angiosperms with emphasis on ***Laurelia novae-zelandiae*** (Monimiaceae). *Cytologia* 34: 627 – 634.

TANG, Y., H. GAO & J. XIE. 2009. An embryological study of ***Eriolaena candollei*** Wallich (Malvaceae) and its systematic implications. *Flora* 204: 569 -580.

TEBBITT, M. 1999. The systematic significance of the endothecium in Begoniaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* 131: 203 -221.